مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۳۴، شماره ۱، سال ۱۳۹۷

واکنش فلورسانس کلروفیل در ارقام گلابیِ حساس و متحمل به بیماری آتشک در شرایط کلروپلاستی فعال و غیرفعال

Chlorophyll Fluorescence Response in Susceptible and Tolerant Pear Cultivars to Fire Blight in Active and Inactive Chloroplast Conditions

زینب صالحی[۱]، حمید عبداللهی[۲] و سیدمهدی میری[۳]

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۹

چکیده

صالحی، ز.، عبداللهی، ح.، و میری، س. م. ۱۳۹۷. واکنش فلورسانس کلروفیل در ارقام گلابیِ حساس و متحمل به بیماری آتشک در شرایط کلروپلاستی فعال و غیرفعال. مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۳۴: **۸۷- ۷۳.**

بیماری آتشک در اثر متقابل با درختان میزبان، خسارت قابل‌توجهی را از طریق انفجار اکسیداتیو و در نهایت نکروز بافت‌ها ایجاد می‌کند. در این تحقیق به‌منظور بررسی نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی در این اثر متقابل، به ارزیابی واکنش فلورسانس کلروفیل در ارقام گلابی حساس و متحمل به بیماری در شرایط کلروپلاست‌های فعال و غیرفعال پرداخته شد. به‌منظور مقایسه کلروپلاست‌های فعال و غیرفعال، آزمایش‌ها در شرایط درون شیشه در حضور سوکروز (زنجیره الکترونی کلروپلاستی غیرفعال) و عدم حضور سوکروز (زنجیره الکترونی کلروپلاستی فعال) انجام شد. نتایج نشان داد پیشرفت بیماری در رقم حساس‌تر و همچنین در حضور سوکروز سریع‌تر بود. همچنین شاخص‌های فلورسانس کلروفیل حداقل (Fo) و حداکثر (Fm) در حضور سوکروز در مقایسه با شرایط عدم حضور سوکروز کاهش یافت؛ بنابراین نقش منفی حضور سوکروز در فعالیت کلروپلاست‌ها تأیید شد. مقایسه تأثیر حمله پاتوژن بر شاخص‌های فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز نشانگر تأثیر حداقلی حمله پاتوژن بر شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل در حضور سوکروز بود، در حالی که در رقم حساس و در شرایط عدم حضور سوکروز این شاخص تغییرات زیادی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: گلابی، *Erwinia amylovora*، نکروز، زنجیره انتقال الکترون، سوکروز.

نویسنده مسئول: h.abdollahi@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora*، ازجمله مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار و به‌ویژه درختان گلابی و به در کشور است (Zakeri and Sharif Nabi, 1991؛ Maroofi and Mostafavi, 1996). این بیماری در سال ۱۳۶۸ برای اولین بار در کشور، در برغان کرج مشاهده و گزارش شد (Zakeri and Sharif Nabi, 1991). اولین طغیان بیماری در سال ۱۳۷۳ در قزوین و سلماس به وقوع پیوست (Mazarei *et al*., 1994) و در سال‌های اخیر طغیان بیماری در مناطق مرکزی کشور مشاهده شده است. باکتری عامل این بیماری، در اثر متقابل سازگار با درختان میوه میزبان، انواع متعددی از پروتئین‌های مؤثره نظیر HrpA، HrpN، HrpW، AvrRpt2 و HopC1 و پروتئین‌های اختصاصی بیماری نظیر DspA/E را تولید کرده و سبب کلونیزه کردن بافت‌ها، ایجاد نکروز و درنهایت مرگ سلولی و پیشرفت بیماری می‌شود (Oh and Beer, 2005؛ Oh *et al*., 2010).

پاسخ بافت‌های میزبان به حمله باکتری عامل آتشک، به‌صورت انفجار اکسیداتیو بوده (Venisse *et al*., 2001) و رفتارهای متفاوتی در میزان و نوع این انفجار اکسیداتیو در ارقام حساس و متحمل به بیماری مشاهده و گزارش شده است (Abdollahi *et al*., 2015). تاکنون نقش دو اندامک میتوکندری (Xie and Chen, 2000) و کلروپلاست (Abdollahi *et al*., 2015) در این اثر متقابل گزارش شده است. میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم به‌عنوان سه منشاء اصلی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاهان شناخته شده‌اند. اگرچه بیان شده که پراکسی‌زوم‌ها به‌عنوان یکی از مراکز اصلی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی هستند (Bhattacharjee, 2011)، ولی تاکنون مدرکی مبنی بر درگیر بودن این اندامک در اثر متقابل بین باکتری *E. amylovora* و میزبان‌های بیماری گزارش نشده است. از سوی دیگر، علی‌رغم نقش کلیدی انفجار اکسیداتیو در اثر متقابل این باکتری با گیاهان میزبان، به دلیل شناخت کم‌تر جزئیات این اثر متقابل، تاکنون سهم هر یک از این دو اندامک، در این اثر متقابل و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن درگیر در فرآیند انفجار اکسیداتیو مقایسه نشده است.

در سال‌های اخیر استفاده از خاصیت فلورسانس کلروفیل به‌صورت گسترده‌ای در جهت گزینش گیاهان برای مقاومت به تنش‌های مختلف نظیر تنش سرمای بهاره (Khanizadeh and Deell, 2005) و زمستانه (Percival and Henderson, 2003)، تنش خشکی (Fernandez *et al*., 1997) و بیماری‌ها موردتوجه قرار گرفته است. پاسخ فلورسانس کلروفیل، یک شاخص تهییج انرژی در ساختارهای فتوسنتزی برگ بوده و به‌عنوان

یک سیستم تشخیص سریع و غیر مخرب برای تعیین مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی و به‌ویژه تنش‌های غیرزنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Percival and Henderson, 2003). این رفتار در اثر پدیده تأثیر سازگاری با تاریکی (Dark adaptation effect) که در زنجیره‌های انتقال الکترون کلروپلاست انجام می‌شود و برای اولین بار توسط کاوتسکی و هیرش (Kautsky and Hirsch, 1931) گزارش شد، بروز می‌کند. در این پدیده، در شرایط عدم حضور نور، تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره برقرار شده و شاخص فلورسانس کلروفیل در میزان حداقل (Fo) است. با افزایش ناگهانی تابش، فلورسانس کلروفیل به حداکثر (Fm) می‌رسد. تفاوت فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر (Fv) به عنوان شاخصی که بیانگر وضعیت تنش در گیاه است، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Anonymous, 2004).

لازم به ذکر است که تغییر در رفتار فلورسانس کلروفیل به‌عنوان یک تغییر ثانویه در واکنش به تنش‌های غیرزنده در گیاهان استفاده و گزارش شده است، درحالی‌که بر اساس بررسی‌های اخیر باکتری عامل بیماری آتشک، به‌طور مستقیم زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست را تحت تأثیر قرار داده و از آن به‌عنوان مرکز تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در راستای ایجاد انفجار اکسیداتیو استفاده می‌کند. بر این اساس با توجه به این‌که تغییرات فلورسانس کلروفیل، انعکاس مستقیمی از میزان الکترون و سطح تنش در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها است، تحقیق حاضر با هدف بررسی کامل نقش این زنجیره در اثر متقابل بین باکتری *E. amylovora* و درخت گلابی و همچنین بررسی نقش احتمالی این زنجیره در تعیین شدت حساسیت و یا تحمل به بیماری آتشک انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه باکتری

ارقام گلابی حساس و متحمل به بیماری آتشک به‌ترتیب شامل رقم بارتلت (Bartlett) (نام معادل رقم ویلیامز-Williams) و رقم درگزی (Erfani *et al*., 2013) به‌وسیله کشت ریزقلمه در محیط درون شیشه مستقر شدند. به این منظور در آغاز فصل بهار سرشاخه‌های جوان ارقام فوق، از باغ تهیه و در آزمایشگاه به قطعات تک جوانه تقسیم و بعد از شستشو و سترون کردن، به ظروف شیشه‌ای حاوی کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA، یک‌دهم میلی‌گرم بر لیتر NAA، سی میلی‌گرم در لیتر سوکروز که با ۰/۶٪ آگار جامد شده بود منتقل و سپس در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی ایجاد شده با لامپ‌های فلورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و در دمای شبانه‌روزی ۱± ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و نگهداری شدند. پس از استقرار و رشد اولیه شاخه‌چه‌های تازه

رشـد کـرده و فاقـد آلـودگی، بـه‌منظور تسـریع در سـرعت پـرآوری بـه محـیط QL تغییریافتـه بـر اسـاس لـبلای و همکـاران (Leblay *et al*., 1991) با افزایش میزان کلسیم بـه ۶/۴ میلی‌مـول، آمونیـوم بـه ۷/۵ میلی‌مـول و نیتـرات بـه ۳۷/۶ میلی‌مـول در مقایسـه بـا QL معمـولی (Quoirin and Lepoivre, 1977) و با نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد بهینه‌سازی‌شـده بـرای گلابی‌هـای گونـه *P. communis* L. بـر اسـاس عبـداللهی و همکـاران (Abdollahi *et al*., 2005) شـامل یـک میلی‌گرم بر لیتـر BAP، یـک میلی‌گـرم بـر لیتـر 2iP، یک‌دهم میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین یک گرم بر لیتر پکتین مرکبات با فواصل زمانی شش هفته یک بار زیـر کشـت شـدند. بـه دلیـل ابعـاد گـرد سنسـور دسـتگاه ارزیـابی خاصـیت فلورسانس کلروفیل (R=10 mm) و عدم توسعه کافی برگ‌های گلابی در محیط پرآوری فـوق، جهت قرارگرفتن در سنسور ارزیـابی پدیـده اثـر سازگاری با تاریکی، شاخه‌چه‌های پرآوری‌شده به محیط ریشه‌زائی گلابی حاوی نمک‌های پایه QL همراه با یک میلی‌گرم بـر لیتـر IBA منتقـل شدند. محیط‌های ریشه‌زایی استفاده‌شـده حـاوی ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و ۵/۵ گرم بر لیتر آگار بودند. اسیدیته کلیه محیط‌ها قبل از افزودن آگار در حـد ۵/۵ تنظـیم شـد. کلیـه شـاخه‌چه‌های مورداستفاده برای ریشه‌زایی به مدت چهار هفته در محیط حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد قرارگرفته و بعد از گذشت این مدت، هم‌زمان بـا آغـازش کالوس‌های تازه و سفید رنگ در انتهای آن‌هـا، به محیط عاری از تنظیم کننده‌های رشـد منتقـل شـدند (Nourmohammadi *et al*., 2015؛ Khodaee Chegenee *et al*., 2011). ایـن روند سبب تولیـد برگ‌هـای توسعه‌یافتـه روی مواد گیاهی درون شیشه گلابی که دارای ریشـه بودند، شد و به دلیل توسعه سطح بـرگ، امکـان اسـتفاده آن‌هـا در سنسـور دسـتگاه ارزیـابی فلورسانس کلروفیل فراهم شد.

پـس از تولیـد گیاهچـه‌های فـوق، بـه‌منظور بررسـی رفتـار فلورسـانس کلروفیـل در اثر متقابل بین باکتری عامـل بیمـاری آتشـک بـا ارقـام گلابـی، سـویه Ea273 عامـل بیمـاری (ATCC No. 49946, USA) در محیط کشـت لوریـا- برتـانی (LB) مـایع، شـب‌گذران شـده و بـر اسـاس روش عبـداللهی و همکـاران (Abdollahi *et al*., 2004) آلوده شدند. غلظت مایه تلقیح مورداستفاده در بافر فسـفات اتـوکلاو شـده، روی کـدورت ۲ (OD=2) بـه‌منظور بـه حـداقل رسـانیدن احتمـال فـرار سرشـاخه‌ها از آلـودگی تنظـیم شـد. بـه‌منظور کشـت تـوأم، ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح به لوله آزمایش حـاوی محـیط کشـت QL افـزوده و سـپس ریزشـاخه‌چه‌های سـه تـا چهـار سـانتی‌متری کـه دارای طول میان‌گره‌هـای یکنـواختی بودنـد، در محـیط مسـتقر شـدند. مقایسـه سـرعت پیشـرفت نکـروز بـر اسـاس دو شـاخص درصـد طـول شاخه‌چه نکروزه به طول کل شاخه‌چه و درصـد میان‌گره‌های نکروزه به تعداد کل میان‌گره‌هـای

نکروزه در بازه زمانی پس از آلوده‌سازی بر اساس حداکثر زمان موردنیاز برای رسیدن نکروز به ۱۰۰ درصد در شاخه‌چه‌های هر دو رقم گلابی و با فواصل زمانی ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند. به دلیل درون شیشه بودن مواد گیاهی مورداستفاده و عدم امکان سترون‌سازی سنسور دستگاه، ارزیابی شاخص‌های میزان حداقل (Fo) و حداکثر (Fm) فلورسانس کلروفیل به‌صورت تخریبی، با خارج کردن شاخه‌چه‌ها از شرایط درون شیشه انجام شد. ارزیابی شاخص‌های فوق در سه برگچه درون شیشه و در پنج تکرار بیولوژیک در هر زمان نمونه‌برداری و در همان بازه زمانی ارزیابی نکروز و با همان فواصل زمانی ۲۴ ساعت یک‌بار انجام شد. به دلیل این‌که در شرایط معمول درون شیشه، به دلیل وجود سوکروز، فعالیت فتوسنتزی به حداقل ممکن افت می‌کند (Abdollahi *et al.*, 2015)، کلیه آزمایش‌های تأثیر متقابل باکتری- میزبان، در شرایط حضور سوکروز و عدم سوکروز در محیط مورد مقایسه قرار گرفتند. به‌منظور آماده‌سازی قبلی و فعال‌سازی سیستم فتوسنتزی مواد گیاهی مورداستفاده در شرایط فاقد سوکروز، پنج روز قبل از آلوده‌سازی، مواد فوق به محیط فاقد سوکروز منتقل و سپس در شرایط مشابه با عامل بیماری تلقیح شدند.

به‌منظور ارزیابی فعالیت باکتری در محیط رشد که سبب افت سریع pH در مقایسه با گیاه می‌شود، محلول مادری نشانگر برموکرزول سبز (Green bromo cersol) با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌های کشت اضافه و تغییرات pH محیط با استفاده از محلول‌های استاندارد pH حاوی نشانگر فوق به‌صورت مقایسه‌ای در طول آزمایش‌ها بر اساس سیستم ارزیابی اثر متقابل باکتری عامل بیماری آتشک و گلابی (Abdollahi *et al.*, 2004) ردیابی شد. کلیه آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام و محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

پیشرفت بیماری در سرشاخه‌ها

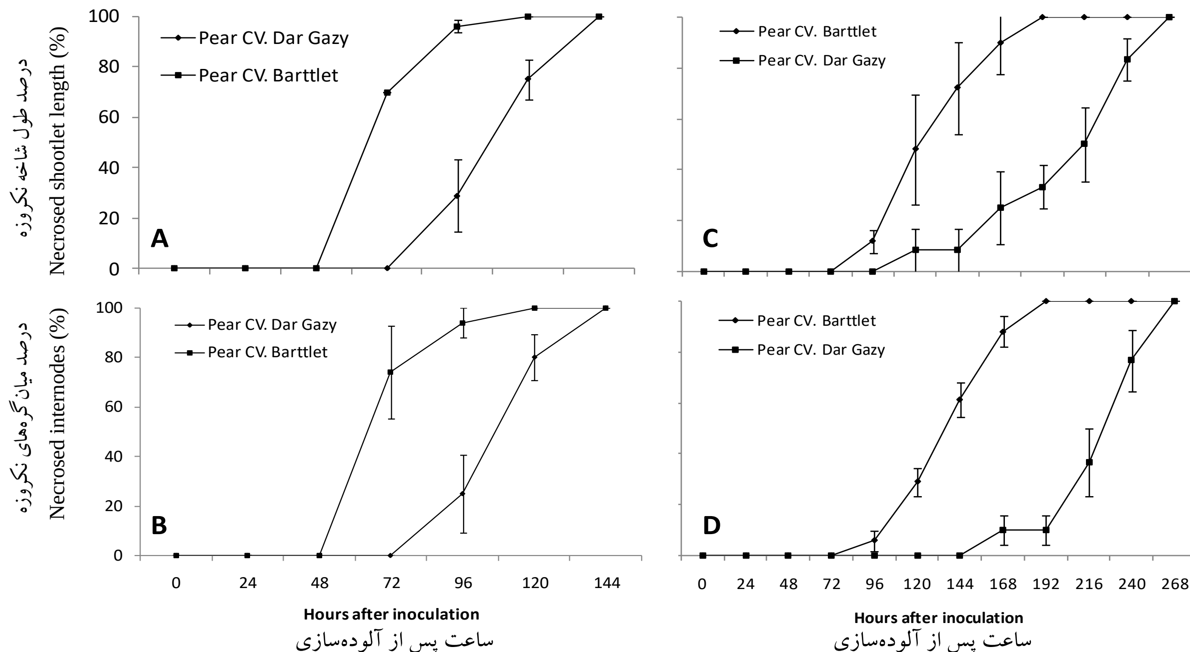
نتایج بیانگر موفقیت کامل مایه‌زنی در دو رقم مورد بررسی در شرایط وجود سوکروز و فاقد سوکروز در محیط کشت بود و در هیچ یک از شاخه‌چه‌های تلقیح‌شده با باکتری عامل بیماری، فرار از آلودگی مشاهده نشد. از سوی دیگر، با توجه به انتخاب قبلی دو رقم با حساسیت متفاوت نسبت به بیماری، اولین علائم در شرایط وجود سوکروز در رقم حساس به آتشک بارتلت، در ۴۲ ساعت پس از تلقیح مشاهده و با سرعت نسبتاً سریع نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون شیشه، طی ۴۸ ساعت پس از ظهور اولین علائم، میزان نکروز به ۱۰۰ درصد رسید (شکل ۱). ظهور اولین علائم در رقم درگزی ۷۲ ساعت پس از تلقیح و نکروز با سرعت کم‌تر در این رقم، به ۱۰۰ درصد رسید که نتایج بر اساس گزارش قبلی عبداللهی و

همکـــاران (Abdollahi *et al*., 2004) نشان‌دهنده این است که در شرایط درون شیشه، تحمل به بیماری به‌صورت تـأخیر در پیشـرفت علائـم ظهـور کـرده و در شـرایط ارزیـابی گلخانـه‌ای، بـه دلیـل وجـود بافت‌هـای چـوبی، تحمـل بـه بیمـاری آتشـک به‌صـورت پیشـرفت نهـائی کم‌تـر در سرشـاخه‌های آلـوده‌شـده ظهـور پیـدا می‌کنـد (Erfani *et al*., 2013). گزارش‌های قبلی نشان داد که حضور سـوکروز سـبب فعالیـت حـداقلی فتوسـنتزی گیاهـان در شـرایط درون شیشـه (Iglesias *et al*., 2001) بـه‌ویژه در سـطح فعالیـت آنـزیم روبیسـکو (Fuentes *et al*., 2005) و زنجیـره انتقـال الکتـرون کلروپلاسـتی (Yabuta *et al*., 2007) خواهد شـد. بـر ایـن اسـاس، بـا توجـه بـه نقـش زنجیره انتقال الکتـرون کلروپلاسـتی گلابـی در اثـر متقابـل بـا بـاکتری عامـل آتشـک و انفجـار اکسیداتیو ناشی از این اثر متقابل، ظهـور علائـم در شرایط حضـور سـوکروز در محـیط کشـت، نشـان‌دهنده ایـن اسـت کـه بـه‌غیراز زنجیـره الکترونی این اندامک، سایر اندامک‌های درگیر در تولیـد رادیکال‌هـای فعـال اکسـیژن و ایجـاد انفجـار اکسـیداتیو (Bhattacharjee, 2011)، می‌تواننـد در پیشـرفت بـاکتری در میزبـان مـؤثر باشند. همچنین مقایسـه سـرعت پیشـرفت علائـم نکروز در شرایط عدم حضور و حضور سوکروز بیانگر تأخیر قابل‌توجه در شـرایط عـدم حضـور سـوکروز در شـاخه‌چه‌ها در دو رقـم بارتلـت و درگزی بود (شکل ۱).

پاسخ فلورسانس کلروفیل

مقایسـه شـاخص حـداقل فلورسـانس کلروفیـل (Fo) در شرایط حضور و عدم حضور سـوکروز در شاخه‌چه‌های آلوده و غیر آلوده نشان داد که این شاخص با حضور سوکروز در محیط کشت بـه میـزان قابـل‌توجهی نسـبت بـه شـرایط عـدم حضور سوکروز کـاهش یافـت (شـکل ۲). ایـن نکته نتـایج تحقیقـات دیگـران مبنـی بـر ایـن‌کـه حضور سوکروز زیـاد در محـیط سـبب فعالیـت حداقلی فتوسنتز گیاهان در شـرایط درون شیشـه (Iglesias *et al*., 2001) در سطح زنجیره انتقال الکتـرون کلروپلاسـتی (Yabuta *et al*., 2007) است را تأیید می‌کند.

مقایسه تأثیر حملـه بـاکتری بـر شـاخص حـداقل فلورسانس کلروفیل در شرایط حضور سوکروز، نشـانگر تـأثیر حـداقلی ایـن حملـه بـر شـاخص مـذکور اسـت (شـکل ۲). بـا توجـه بـه اهمیـت حضــور الکتــرون در زنجیــره انتقــال الکتــرون کلروپلاســتی بــه‌منظور بــروز واکنش‌هــای اکسیداتیو و فلورسانس در شرایط تنش، طبیعـی است که حضور سوکروز زیاد در محیط، سـبب غیرفعال شدن زنجیره و عـدم بـروز واکنش‌هـای فلورسانس کلروفیل در این شـرایط شـده اسـت. بـرعکس در شـرایط عـدم حضـور سـوکروز در محیط کشت، سطح بسیار بالاتر شاخص حـداقل فلورسـانس کلروفیـل در هـر دو رقـم گلابـی قابل‌مشـاهده اسـت و تـأثیر حملـه بـاکتری بـر شاخص حداقل فلورسانس کلروفیـل بـه‌ویژه در رقـم حسـاس بارتلـت مشـاهده شـد (شـکل ۲).



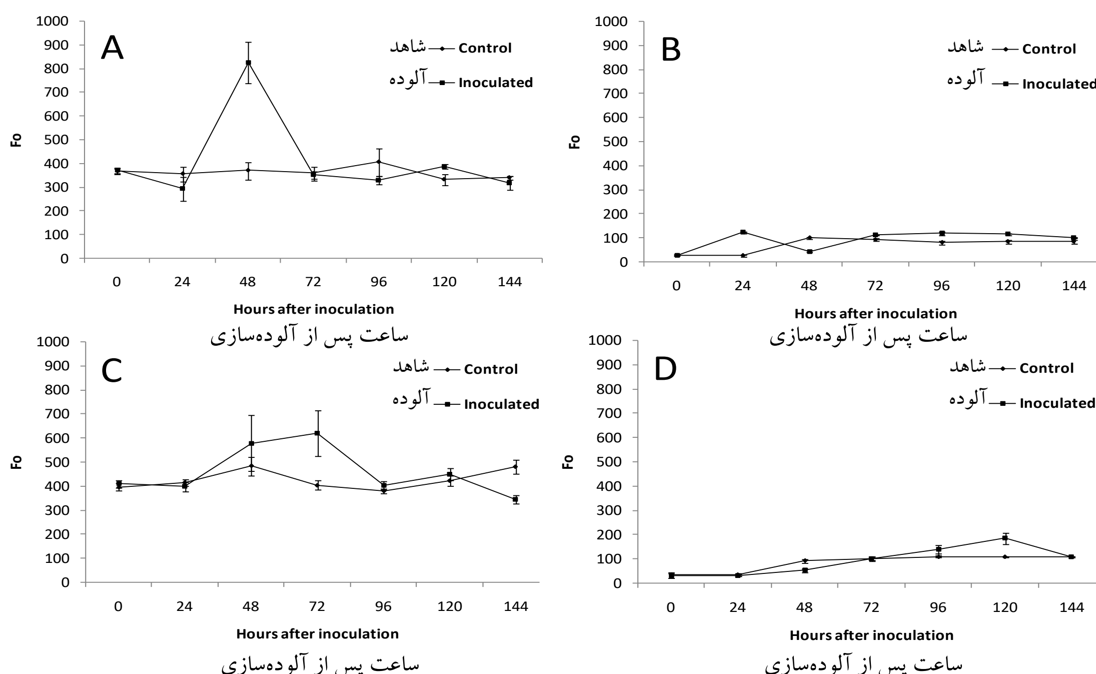
شکل ۱- مقایسه پیشرفت نکروز حاصل از عامل بیماری آتشک (*E. amylovora*) بر اساس درصد میان‌گره‌های نکروزه و درصد طول شاخه نکروزه در رقم حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت.

A: درصد طول شاخه نکروزه با حضور سوکروز؛ B: درصد میان‌گره‌های نکروزه با حضور سوکروز؛ C: درصد طول شاخه نکروزه بدون حضور سوکروز؛ D: درصد میان‌گره‌های نکروزه بدون حضور سوکروز.

ارزش‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 1. Comparison of the necrosis progress caused by fire blight causal agent (*E. amylovora*) according to percentage of necrosed internodes and percentage of necrosed shootlet length in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence and sucrose absence conditions.
A: Percentage of necrosed shootlet length in sucrose presence condition; B: Percentage of necrosed internodes in sucrose presence condition; C: Percentage of necrosed shootlet length in sucrose absence condition; D: Percentage of necrosed internodes in sucrose absence condition.
The values are means ± standard errors.

همانند شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل، شاخص حداکثر فلورسانس کلروفیل (Fm) نیز با حضور سوکروز در محیط کشت به میزان قابل‌توجهی نسبت به شرایط عدم حضور سوکروز در محیط کشت کاهش یافت (شکل ۳). این رفتار نیز تأیید می‌کند که حضور سوکروز زیاد در محیط، سبب فعالیت حداقلی فتوسنتز گیاه در سطح زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی (Yabuta *et al.*, 2007) خواهد شد. بنابراین برخلاف شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل که در شرایط فاقد سوکروز و حمله بیماری افزایش قابل‌توجهی به‌ویژه در رقم حساس نشان داد (شکل ۲)، شاخص حداکثر فلورسانس کلروفیل افزایش قابل‌توجهی نداشت (شکل ۳). با توجه به این‌که تأثیر حمله باکتری *E. amylovora* روی

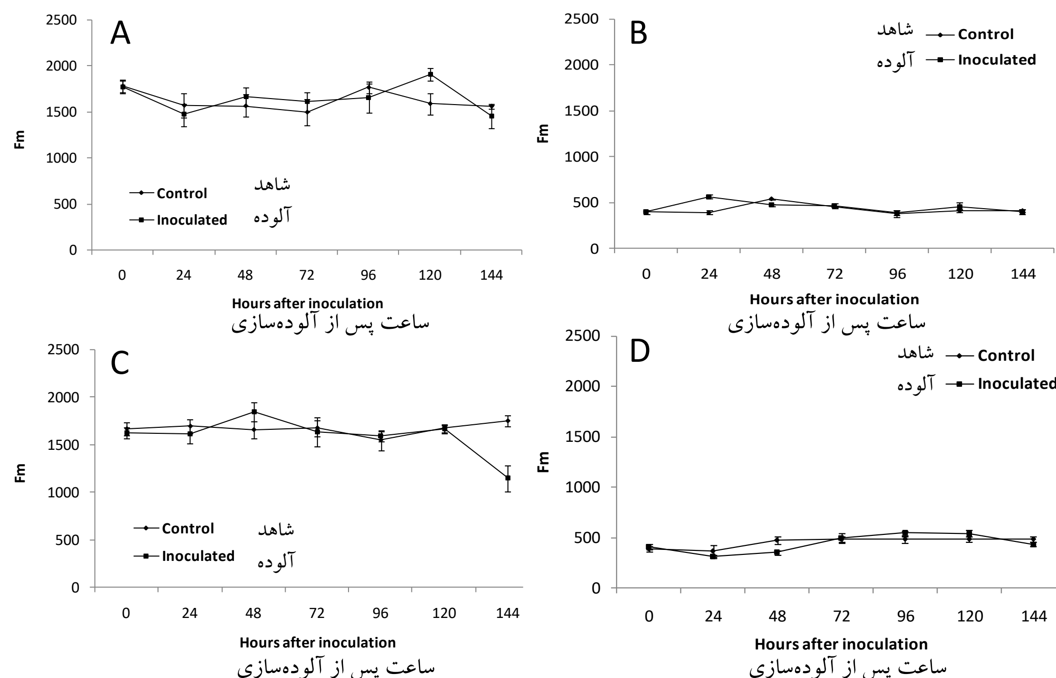


شکل ۲- مقایسه تغییرات شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل (Fo) در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده‌شده با باکتری *E. amylovora* در رقم گلابی حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت.

A: رقم حساس (بارتلت) بدون حضور سوکروز؛ B: رقم حساس (بارتلت) با حضور سوکروز؛
C: رقم متحمل (درگزی) بدون حضور سوکروز؛ D: رقم متحمل (درگزی) با حضور سوکروز.
ارزش‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 2. Comparison of the variation in the minimum chlorophyll fluorescence (Fo) in control and inoculated pear shootlets by *E. amylovora* in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence and sucrose absence conditions.
A: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose absence condition; B: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose presence condition; C: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose absence condition; D: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence condition. The values are means ± standard errors.

بافت‌های گیاه یک تأثیر سریع است، به نظر می‌رسد که برخلاف تنش‌های طولانی‌مدت محیطی، به‌ویژه تنش‌های غیرزنده نظیر سرمای بهاره (Khanizadeh and Deell, 2005) و خشکی (Fernandez *et al*., 1997) که به‌صورت تغییر در میزان شاخص حداکثر فلورسانس کلروفیل در نتیجه تغییر در تعداد کل کلروپلاست‌ها بروز می‌کند، در این شرایط به دلیل سرعت تأثیر باکتری روی بافت‌ها، شاخص حداکثر فلورسانس کلروفیل به‌صورت ثابت باقی خواهد ماند. برخلاف این شاخص، شاخص حداقل فلورسانس کلروفیل به دلیل تفاوت نوع و این‌که تا حد زیادی به جریان الکترونی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی بستگی



شکل ۳- مقایسه تغییرات شاخص فلورسانس کلروفیل حداکثر (Fm) در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده‌شده با باکتری *E. amylovora* در رقم گلابی حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت.

A: رقم حساس (بارتلت) بدون حضور سوکروز؛ B: رقم حساس (بارتلت) با حضور سوکروز؛

C: رقم متحمل (درگزی) بدون حضور سوکروز؛ D: رقم متحمل (درگزی) با حضور سوکروز.

ارزش‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 3. Comparison of the variation in the maximum chlorophyll fluorescence (Fm) in control and inoculated pear shootlets by *E. amylovora* in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence and sucrose absence conditions.

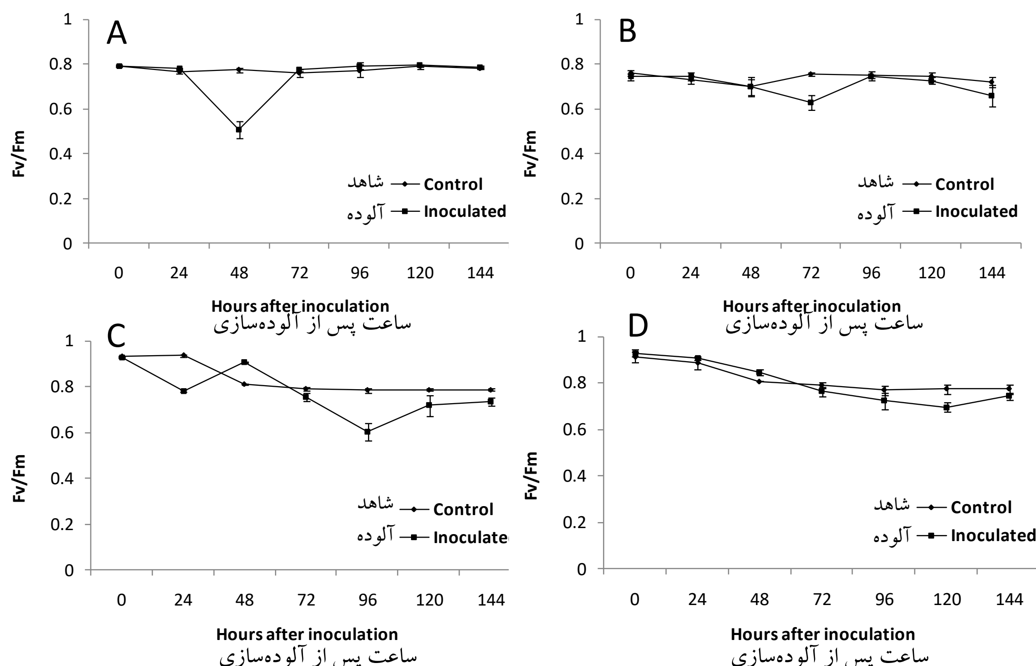
A: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose absence condition; B: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose presence condition; C: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose absence condition; D: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence condition. The values are means ± standard errors.

داشته و تأثیرپذیر از تغییرات کوتاه‌مدت و سریع زنجیره الکترونی است، در شرایط عدم حضور سوکروز در محیط، تفاوت قابل‌توجهی را در شرایط گیاه آلوده و غیر آلوده و همچنین دو رقم حساس و متحمل نشان داد. با توجه به این که در شرایط عدم حضور نور، میزان تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره برقرار و شاخص فلورسانس کلروفیل میزان حداقل (Fo) است، در شرایط عدم حضور سوکروز (زنجیره الکترونی فعال)، به نظر می‌رسد در رقم حساس به دلیل بالاتر بودن سطح عدم تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره، میزان شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل، به میزان قابل‌توجهی نسبت به رقم متحمل درگزی بالاتر

بوده است (شکل ۲). برخلاف این، به نظر می‌رسد که رقم متحمل از توان مهار بالاتری در سطح تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره در شرایط حمله باکتری برخوردار بوده و این امر به‌صورت افزایش محدود شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل در این رقم نمود پیدا کرده است. همچنین برخلاف دو شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر که در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در گیاهان غیر آلوده تفاوت قابل‌توجهی نشان دادند (شکل ۲ و ۳)، شاخص تفاوت فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر (Fv) تفاوتی را در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در گیاهان غیر آلوده نشان نداد. دلیل این امر می‌تواند تأثیرپذیری یکنواخت هر دو شاخص فلورسانسی کلروفیل حداقل و حداکثر و حفظ نسبت مذکور در شرایط عدم آلودگی باشد. برخلاف این، در شرایط آلوده‌سازی میزبان‌ها با باکتری عامل آتشک، در شرایط عدم حضور سوکروز در محیط، به دلیل تغییرات قابل‌توجه شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل، شاخص تفاوت فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر (Fv) نیز در این شرایط دچار تغییرات قابل‌توجهی، به‌ویژه در رقم حساس‌تر بارتلت شد (شکل ۴).

در یک ارزیابی کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که شرایط حذف سوکروز در محیط کشت می‌تواند به نحو مؤثری به فعال‌سازی زنجیره انتقال الکترون و کلروپلاست‌ها منجر شود که از این نظر با نتایج به‌دست‌آمده توسط عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al*., 2015) که نشان دادند در شرایط عدم حضور سوکروز، استفاده از بازدارنده‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، سبب ایجاد نکروز در شاخه‌چه‌های سیب و گلابی درون شیشه خواهد شد منطبق است. برخلاف این، در صورت حضور سوکروز در محیط، هیچ‌گونه نکروزی در اثر استفاده از بازدارنده‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی روی شاخه‌چه‌های مذکور مشاهده نشد. دلیل این امر، ایجاد فقر غذائی حاصل از وجود بازدارنده در شرایط عدم حضور سوکروز بوده که به مرگ گیاه منجر می‌شود. برعکس، در حضور سوکروز، اولاً نیاز گیاه به کربوهیدرات، نه از طریق فتوسنتز، بلکه از طریق جذب سوکروز از محیط مورد تأمین قرار می‌گیرد و از طرفی به دلیل غیرفعال بودن زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی و نقش غیر مؤثر آن در تأمین انرژی گیاه، استفاده از بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی سبب ایجاد فقر غذائی و نکروز در شاخه‌چه‌ها نخواهد شد. نتایج فوق به نحو مطلوبی با نتایج دو شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل و حداکثر که در شرایط حضور سوکروز کاهش قابل‌توجهی در این تحقیق نشان داد مطابقت داشت.

از سوی دیگر، حذف سوکروز از محیط، سبب شد تا ظهور نکروز در شاخه‌چه‌های گلابی هر دو رقم حساس و متحمل، به میزان قابل‌توجهی با تأخیر همراه شود، اگرچه تفاوت



شکل ۴- مقایسه تغییرات شاخص نسبت فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm) در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده‌شده با باکتری *E. amylovora* در رقم گلابی حساس به آتشک (بارتلت) و رقم متحمل به آتشک (درگزی) در شرایط حضور و عدم حضور سوکروز در محیط کشت.
A: رقم حساس (بارتلت) بدون حضور سوکروز؛ B: رقم حساس (بارتلت) با حضور سوکروز؛
C: رقم متحمل (درگزی) بدون حضور سوکروز؛ D: رقم متحمل (درگزی) با حضور سوکروز.
ارزش‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد، بیان شده است.

Fig. 4. Comparison of the variation in the chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) in control and inoculated pear shootlets by *E. amylovora* in fire blight susceptible cultivar (Bartlett) and tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence and sucrose absence conditions.
A: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose absence condition; B: Susceptible cultivar (Bartlett) in sucrose presence condition; C: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose absence condition; D: Tolerant cultivar (Dar Gazi) in sucrose presence condition. The values are means ± standard errors.

زمانی در اثر تحمل بیش‌تر رقم درگزی به بیماری همچنان در شرایط حذف سوکروز از محیط نیز مشاهده شد. چنانچه اشاره شد تاکنون نقش دو اندامک میتوکندری (Xie and Chen, 2000) و کلروپلاست (Abdollahi *et al.*, 2015) در اثر متقابل باکتری عامل بیماری آتشک با گیاهان میزبان گزارش شده است. این اندامک‌ها به‌عنوان منشأ تولید گونه‌های فعال اکسیژن عمل نموده و هر نوع از گونه‌های فعال اکسیژن، نقش متفاوتی را در ایجاد تحمل و یا حساسیت به بیماری بر عهده دارند (Azarabadi, 2014). با توجه به این‌که بر اساس این گزارش، نقش گونه فعال اکسیژن H_2O_2 به‌صورت ایجاد تحمل به بیماری

و نقش رادیکال هیدروکسیل به‌صورت ایجاد حساسیت به بیماری آتشک مشاهده می‌شود، به نظر می‌رسد که نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی سهم مؤثرتری در تولید گونه فعال اکسیژن H_2O_2 داشته، بدین‌صورت که حذف سوکروز از محیط و فعال‌سازی این زنجیره سبب ایجاد تأخیر قابل‌توجه در بروز علائم در هردو رقم شده است. بر این اساس، با توجه به این‌که غیر فعال‌سازی موقت زنجیره انتقال الکترون اندامک‌ها می‌تواند به‌عنوان مکانیسمی در کاهش خسارت بیماری در میزبان‌های آتشک مدنظر قرار گیرد، در ادامه بررسی‌ها روی مقایسه نقش اندامک‌ها در اثر متقابل باکتری-میزبان، لازم است میزان سهم دو اندامک میتوکندری و کلروپلاست به نحو دقیق‌تری در ایجاد گونه‌های مختلف فعال اکسیژن (به‌ویژه گونه فعال اکسیژن H_2O_2) و درنتیجه ایجاد مقاومت و یا حساسیت در میزبان مدنظر قرار داده شود.

درنهایت مقایسه شاخص فلورسانسی کلروفیل حداقل و حداکثر در گیاهان آلوده‌شده با عامل بیماری آتشک و شاهد بیانگر تأثیر قابل‌توجه و زودهنگام حمله بیماری، در زمانی بسیار زودتر از ظهور علائم روی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها بود. این نتایج به نحو مؤثری تأییدی بر گزارش اخیر عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al*., 2015) مبنی بر نقش این زنجیره در اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با گیاهان میزبان است. از طرفی مقایسه شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل در دو رقم حساس و متحمل به بیماری در پاسخ به حمله باکتری عامل بیماری نشان داد که رقم متحمل از توان کنترل بالاتری در سطح تعادل اکسیداسیون و احیاء زنجیره در شرایط حمله باکتری برخوردار بوده و این امر به‌صورت افزایش محدود شاخص فلورسانس کلروفیل حداقل در این رقم مشاهده شد. بر اساس این نتایج، به نظر می‌رسد که نقش اندامک کلروپلاست نه‌تنها در اثر متقابل بین باکتری و گیاه میزبان مؤثر است، بلکه این اندامک دارای مکانیسم(های) ناشناخته‌ای برای تعدیل اثرات مخرب باکتری روی گیاه است که تاکنون موردتوجه قرار نگرفته است. لذا در ادامه پیشنهاد می‌شود ضمن بررسی و مقایسه نقش و وزن دو اندامک میتوکندری و کلروپلاست در تولید گونه‌های فعال اکسیژن، به بررسی و شناسایی مکانیسم‌هایی که می‌توانند در کلروپلاست‌ها سبب ایجاد رفتار اکسیداسیون-احیاء متعادل‌تر در پاسخ به حمله بیماری و درنتیجه ایجاد تحمل بیش‌تر به بیماری نظیر آنچه در رقم درگزی مشاهده شد، پرداخته شود. در این رابطه، اولین ایده میزان حفاظت‌شدگی بسیار بالای ژنوم کلروپلاستی که کد کننده بسیاری از پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها است در سطح یک‌گونه و حتی گونه‌ها نزدیک است. بنابراین این امر می‌تواند با مکانیسم‌های نقطه‌ای در سطح پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها از طریق

مقایسه دو رقم اخیر با استفاده از توال‌یابی معمولی صورت پذیرد. نکته تسهیل‌کننده این امر، وجود توالی کامل ژنوم کلروپلاستی و ژنوم هسته گونه گلابی معمولی در بانک اطلاعاتی است که به طراحی آغازگرهای کاملاً اختصاصی برای نیل به این هدف کمک قابل‌توجهی می‌نماید. همه این موارد ممکن است گره‌گشای ساختار ناشناخته ژنتیکی تحمل به بیماری آتشک در گیاهان میزبان نظیر گلابی باشد.

References

Abdollahi, H., Ghahremani, Z., Erfani Nia, K., and Mehrabi, R. 2015. Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. Photosynthesis Research 124: 231-242.

Abdollahi, H., Muleo, R., and Rugini, E. 2005. Evaluation of different basic salts, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) genotypes. Seed and Plant Improvement Journal 21: 373-384 (in Persian).

Abdollahi, H., Ruzzi, M., Rugini, E., and Muleo, R. 2004. *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 203-212.

Anonymous. 2004. Opti-Sciences OS-30p Chlorophyll Fluorometer Operation Manual. Opti-Sciences Company, Hudson, USA. 51pp.

Azarabadi, S. R. 2014. Assessment of resistance and survey on some tolerance mechanisms to fire blight (*Erwinia amylovora*) in some new pear cultivars and rootstocks. M. Sc. Thesis, Varamin-Pishva Islamic Azad University, Tehran, Iran. 153pp. (in Persian).

Bhattacharjee, S. 2011. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. Pp. 1-30. In: Dutta Gupta, S. (ed.). Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Boca Raton, FL.

Erfani, J., Abdollahi, H., Ebadi, A., Fatahi Moghadam, M. R., and Arzani, K. 2013. Evaluation of fire blight resistance and the related markers in some European and Asian pear cultivars. Seed and Plant Improvement Journal 29-1: 659-672 (in Persian).

Fernandez, R. T., Perry, R. L., and Flore, J. A. 1997. Drought response of young apple trees on three rootstocks. II. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, water relations, and leaf abscisic acid. Journal of the American Society for Horticultural Science 122: 841-848.

Fuentes, G., Talavera, C., Oropeza, C., Desjardins, Y., and Santamaria, J. M. 2005. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 41: 69–76.

Iglesias, D. J., Tadeo, F. R., Legaz, F., Primo-Mill,o E., and Talon, M. 2001. *In vivo* sucrose stimulation of colour change in citrus fruit epicarps: interactions between nutritional and hormonal signals. Physiolgia Plantarum 112: 244–250.

Kautsky, H., and Hirsch, A. 1931. Neue versuche zur kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften 19: 964-964.

Khanizadeh, Sh., and Deell, J. 2005. Chlorophyll fluorescence: a new technique to screen for tolerance of strawberry flowers to spring frost. Small Fruits Review 1: 61-67.

Khodaee Chegenee, F., Abdollahi, H., Ershadee, A., and Esna Ashari, M. 2011. Determination of micro-propagation protocol for OH×F333 and OH×F69 pear clonal rootstocks. Seed and Plant Improvement Journal 27-2: 297-312 (in Persian).

Leblay, C., Chevreau, E., and Robin, L. M. 1991. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant cell, Tissue and Organ Culture 25: 99-105.

Maroofi, A., and Mostafavi, M. 1996. Evaluation of the resistance of apple, pear and quince varieties to fire blight. Acta Horticulturae 411: 395-400.

Mazarei, M., Zakeri, Z., and Hassanzadeh, N. 1994. Fire blight situation on fruit trees in West Azerbaijan and Ghazvin provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 30: 25-32 (in Persian).

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nourmohammadi, N., Abdollahi, H., Moeini, A., and Roohalamin, E. 2015. Effects of growth media and Fe source on micropropagation and rooting of semi-dwarf pear rootstocks, Pyrodwarf and OH×F87. Seed and Plant Improvement Journal 31-1: 265-278 (in Persian).

Oh, C. S., and Beer, S. V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. FEMS Microbiology Letters 253:185–192.

Oh, C. S., Carpenter, S. C. D., Hayes, M. L., and Beer, S. V. 2010. Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of

Erwinia amylovora. Microbiology 156:1211–1220.

Percival, G., and Henderson, A. 2003. An assessment of the freezing tolerance of urban trees using chlorophyll fluorescence. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78: 225-260.

Quoirin, M., and Lepoivre, P. 1977. Etude de mileux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Horticulture 78: 437-442.

Venisse, J. S., Guller G., and Brisset M. N. 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125: 2164-2172.

Xie, Z., and Chen, Z. 2000. Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. Molecular Plant-Microbe Interaction 13: 183-190.

Yabuta, Y., Mieda, T., Rapolu, M., Nakamura, A., and Motoki, T. 2007. Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany 58: 2661–2671.

Zakeri, Z., and Sharif Nabi, B. 1991. Fire blight disease in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Pathology Congress, Kerman, Iran. Pp. 157.